УДК 619:616.98-078:636

А.П. Герилович
(Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», Харьков, Украина)

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖИВОТНЫХ ВИРУСНОЙ ЭТИОЛОГИИ НА ОСНОВЕ ПЦР-АНАЛИЗА

Введение

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) используется в качестве вспомогательного метода при установлении этиологии многих инфекционных и инвазионных заболеваний, а также при идентификации выделенных изолятов возбудителя в ветеринарной и гуманной медицине [1, 2, 3].

С течением времени возникло множество модификаций этого метода (nested, real-time, continuous и другие), позволивших усовершенствовать его по таким параметрам, как чувствительность, специфичность, широта детекции и другим характеристикам [4, 5].

Целью настоящей работы было обобщение принципиальных приемов конструирования праймеров и селекции наиболее высокоспецифичных последовательностей, а также выведение алгоритма успешного создания ПЦР-методики на их основе.

Материалы и методы

При выполнении исследований в описанном направлении нами использованы последовательности генов вирусов ИРТ и ИЛТ, опубликованные в базах данных GeneBank и DDBG.

В ходе анализа последовательностей использованы программы ClustalW, ClustalX, BioEdit (v.7.0.5) [6], Vector NTI (Advance v.9.1), AmplyfX.

При отработке методов амплификации использованы коммерческие реагенты производства Российской Федерации (ООО ИЛС, ИзоГен) и Латвии (Fermentas).

Исследования по отработке ПЦР-протоколов проведены с привлечением штаммов Молдова-93, SL, Cooper вируса ИРТ, а также штаммов ВНИИБП-У и G вируса ИЛТ из коллекций Национального научного центра «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины» (Украина) и Fredrik Loffler Institute (Германия).

Результаты исследований

Если представить оптимизированную методику пошагово, то первым шагом является формирование массива таргетных (целевых) последовательностей. С этой целью необходимо было провести анализ баз данных GeneBank в закладке core nucleotide. В нашем случае ключевыми будут латинизированные или англоязычные названия вирусов ИРТ (Bovine herpesvirus) и ИЛТ (Gallid herpesvirus type 1). Из найденных последовательностей были сформированы подбазы: последовательности генов гликопротеинов, тимидинкиназы и полные геномы.

На следующем этапе работы были проведены множественные выравнивания выбранных последовательностей при помо-

Таблица

Характеристики праймеров для выявления ДНК вирусов ИРТ КРС и ИЛТ

Название	Последовательность	Длина, п.н.	Мол. масса	Образование вторичных структур	Димеризация	Tm, 0C / CG %	nM/ОП
IRTV_gE_fwd	GCT TCG GTC GAC ACG GTC TT	20	5662,8	слаб.	-	68,7/60	33,8
IRTV_gE_fwd	CTT TGT CGC CCG TTG AGT CG	20	6087,0	-	-	70,1/60	34,5
ILTV1 f	gaa acg gtc gac tgg acg tat ttg	24	7415,8	-	-	69,2/50	31,3
ILTV1 r	gga aca gta gca gtt tct aag cac	24	7367,8	-	-	67,3/45	30,6

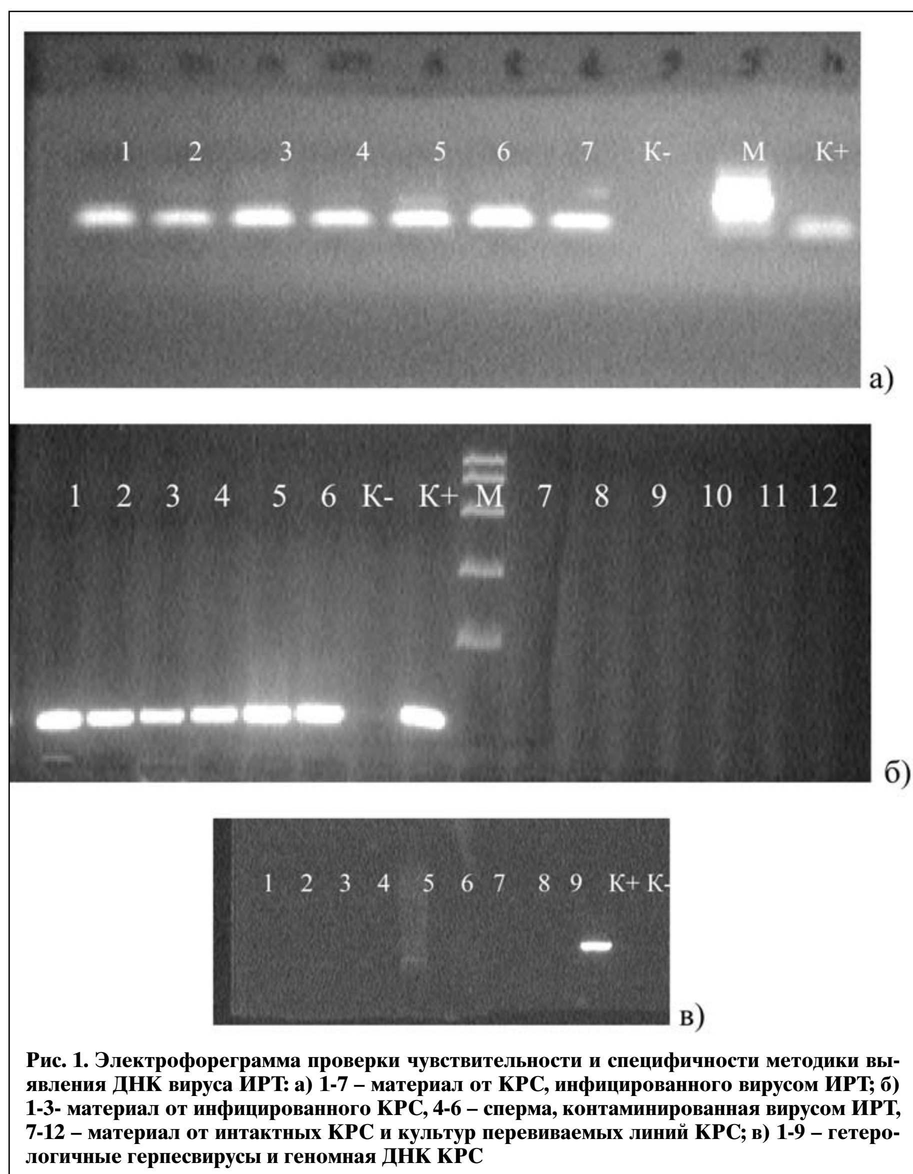


Рис. 1. Электрофореграмма проверки чувствительности и специфичности методики выявления ДНК вируса ИРТ: а) 1-7 – материал от КРС, инфицированного вирусом ИРТ; б) 1-3- материал от инфицированного КРС, 4-6 – сперма, контаминированная вирусом ИРТ, 7-12 – материал от интактных КРС и культур перевиваемых линий КРС; в) 1-9 – гетерологичные герпесвирусы и геномная ДНК КРС

щи программ BioEdit, ClustalW и ClustalX. В качестве таргетного участка для ПЦР-детекции вируса ИРТ КРС определена последовательность гена gE, а для вируса ИЛТ – гена тимидинкиназы (ТК). Выбор именно этих последовательностей был обусловлен наибольшим количеством консервативных участков длиной свыше 25 пар нуклеотидов (п.н.). Ген gE вируса ИРТ содержал 7 консервативных участков, а ген ТК вируса ИЛТ – 6 высококонсервативных зон. При этом GC-содержание во всех упомянутых последовательностях составляло 52-74%, что сыграло решающую роль в выборе их для расчета праймеров. Повышенное GC-содержание способствует повышению температуры плавления олигонуклеотидов и позволяет проводить отжиг при более высоких температурах, обусловливая тем самым высокую специфичность детекции вирусного генетического материала [7, 8, 9].

В результате анализа выявленных консервативных участков гена gE вируса ИРТ и ТК вируса ИЛТ было рассчитано 18 и 14 праймерных пар, соответственно, с помощью и программы AmplyfX, а также 10 и 8 альтернативных праймерных пар с помощью программы Vector NTI (Advance v.9.1). При селекции праймерных участков их оценивали по показателям содержания GC-пар, разница в температурах плавле-

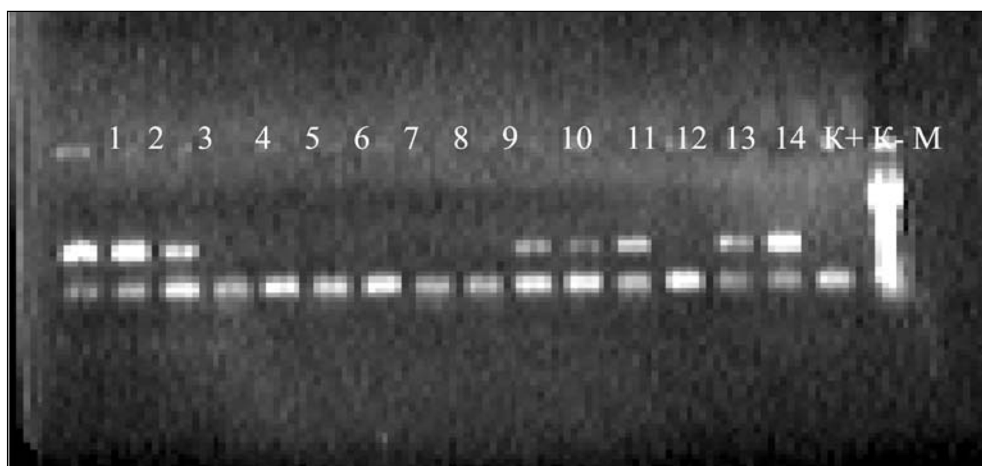


Рис. 2. Электрофореграмма исследования чувствительности и специфичности методики выявления ДНК вируса ИЛТ: 1-3,10-12, 14 – ДНК из разведений культуральных расплодок штаммов G и ВНИИБП-У, 4-6 – ДНК курицы, 7-8 – ДНК перепелки, 9 – ВГИ, 13 – ВБМ

ния не более 3° С, отсутствию образования димерных форм и вторичных структур).

Дальнейший анализ этих праймеров производили по параметрам отжига на матрице с помощью программы AmplyfX и внутривидовой специфичности в FASTA on-line, на основании чего отобрано 2 пары, комплементарных гену gE вируса ИРТ, и 2 пары, комплементарных гену ТК вируса ИЛТ. Из них было синтезировано по одной паре, которые фланкируют фрагмент длиной 245 п.н. гена gE вируса ИРТ и 176 п.н. – гена ТК вируса ИЛТ (табл.).

После рассчета и теоретической проверки праймерной системы предстоит разработать методику выявления ДНК патогена и провести ее валидацию.

Разработка методики выявления генетического материала с помощью ПЦР предполагает подбор методов пробоподготовки (экстракции нуклеиновых кислот), амплификации (по температурным, временным параметрам и характеристикам реакционной смеси).

На первом этапе нами подобраны оптимальные температуры отжига при стандартных значениях концентрации ионов Mg++-1,5 mM/мкл. Для этого ставили реакции на панелях из 10 образцов каждого из вирусов (штамм Cooper вируса ИРТ и штамм G вируса ИЛТ) при различных температурах – от 52 до 65° С.

Было установлено, что оптимальной для выявления ДНК вируса ИРТ является температура 55,5±0,5° С, при которой порог чувствительности эквивалентен активности вируса 2,5 lg $ТЦД_{50}$/мл. При более низких температурах дополнительные разведения вируса не выявлялись, однако, кроме полосы рассчетной длины, на электрофореграмме выявляли дополнительные продукты неспецифического характера. Наибольшую чувствительность реакции при детекции ДНК вируса ИЛТ удалось обеспечить при температуре отжига 57,5±0,5° С. Порог детекции при этом соответствовал активности вируса 0,8 lg EID_{50}/мл.

При подборе оптимального содержания магния на панели с концентрациями от 1,0 до 4 mM/мкл при определенной на предыдущем этапе температуре отжига установлено, что для выявления ДНК обоих вирусов необходимо 2,5 mM/мкл ионов магния. Состав реакционной смеси был оптимизирован для 25 мкл реакционной смеси с 5 ЕД Taq-ДНК-полимеразы.

Следующим этапом работы была проверка чувствительности и специфичности созданных методик в лабораторном эксперименте и их валидация.

С целью проверки специфичности детекции ДНК вируса ИРТ была использована панель из 22 положительных в РИФ образцов спермы, контаминированной вирусом (n=7), клинического материала (n=12) и культуральных расплодок вируса (n=3), а также 38 образцов, отрицательных в РИФ. В результате анализа этих проб установлено, что в 22 РИФ-положительных и 6 РИФ-отрицательных образцах содержится ДНК вируса ИРТ. Это свидетельствует о высокой чувствительности, специфичности и точности результатов. Избирательно пробы панелей были реамплифицированы. Схожесть полученных результатов яви-

лась доказательством воспроизводимости методики выявления ДНК вируса ИРТ.

При определении внутривидовой специфичности установлено отсутствие гибридизации праймеров, фланкирующих ген gE вируса ИРТ с ДНК других герпесвирусов (болезни Ауески, болезни Марека, герпеса индеек) и клеточными ДНК КРС (рис. 1).

Исследование специфичности и чувствительности разработанной методики показало, что минимальный выявляемый титр вируса ИЛТ составляет 0,8 lg EID_{50}/мл. При этом позитивная реакция была получена с ДНК обоих использованных штаммов (G и ВНИИБП-У) в виде эмбриональных и культуральных расплодок. Отрицательными были результаты реакции с гетерологичными герпесвирусами птицы (вирусы болезни Марека и герпеса индеек), образцами геномной ДНК кур и перепелов (рис. 2).

Результаты, полученные при изучении чувствительности и специфичности метода, были воспроизведены в 5 повторах.

Определение валидационных параметров этой методики продолжается в настоящее время.

Заключение: таким образом, предложена система разработки и валидации ПЦР-методик для выявления генетического материала возбудителей вирусных инфекций животных.

Выводы

1. На основании анализа литературных данных и возможностей современного биоинформационного программного обеспечения предложена система разработки и валидации ПЦР-методик, которая подразумевает использование ряда биоаналитических и молекулярно-генетических подходов, направленных на поиск праймерных систем, оценку их качества, подбор оптимальных физических и химических условий ПЦР, определение чувствительности, специфичности, воспроизводимости и точности детекции генетического материала возбудителей вирусной природы.

2. Эффективность данной системы показана на примере разработки методик выявления ДНК вируса ИРТ КРС путем амплификации участка гена gE длиной 245 п.н. и ДНК вируса ИЛТ по 176 п.н. участку гена ТК.

3. При определении некоторых валидационных параметров метода выявления вируса ИРТ КРС методом ПЦР установлено, что он является специфичным, чувствительным, точным, воспроизводимым и имеет порог детекции, эквивалентный титру 2,5 lg $ТЦД_{50}$/мл вируса ИРТ.

РЕЗЮМЕ

Статья посвящена основам изучения генетических детерминант вирусов. Изложены алгоритмы подбора таргетных генов, поиска пар праймеров с помощью биоаналитических программ, анализ их качества, а также теоретической и практической проверки их комплементарности матрице, внутривидовой специфичности. Кроме того, на модели возбудителей герпесвирусных заболеваний (вирус инфекционного ринотрахеита и вирус инфекционного ларинготрахеита птиц) показаны этапы оптимизации ПЦР-протокола и проверки его качественных параметров

SUMMARY

The paper is devoted to the basic principles of viral genetic determinants study. Algorithms for target genes selection, algorithms for primer pairs search using bioanalytical programmes, analysis of their quality, theoretical and practical review of their matrix complementary and intraspecies specificity are described in the paper. Besides, steps for optimization PCR procedures and verification of its quality parameters were demonstrated using agents of herpesvirus disease as a pattern (infectious rhinotracheitis virus and avian infectious laryngotracheitis virus).

Литература

1. Sachse, K. PCR detection of microbial pathogens: methods and protocols. / K. Sachse, J. Frey //Methods in Molecular Biology. Vol. 216. Totowa, NJ: Humana Press. 2003. 277 p.
2. «Практическая Молекулярная Биология» .
3. The validation of diagnostics PCR-methods // O.I.E. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, adopted 05. 2005. [www.oie.int].
4. Meltzer, S.J. PCR in Boanalysis // Methods in Molecular Biology. Vol. 92. Totowa, NJ. :Humana Press Inc. 2001. 274 p.
5. Molecular biology protocols .
6. Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT/T.A. Hall // Nucl. Acids. Symp. Ser. 1999. P. 95-98.
7. Higuchi, R. Simple and rapid preparation of samples for PCR, and PCR Technology /R. Higuchi // Principles and Appltcations for DNA Amplification ed. H.A. Erlich, Stockton, N.Y. 1989. P. 3l-38.
8. Bartlett, J.M.S., PCR protocols, 2nd ed. / J.M.S. Bartlett, D. Stirling Methods in Molecular Biolog.- Vol. 226. Totowa, N.J.: Humana Press, 2003. 556 p.
9. Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини: наук.-метод. посібник / Б.Т. Стегній, А.П. Ґерілович, О.Ю. Лиманська, В.І. [и др.] Харків,: ННЦ «ІЕКВМ», 2006. 110 с.